Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf den Catecholamin- und ATP-Gehalt der Nebennieren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulf Schacht
aus Berlin

1965

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

DER EINFLUSS VON 6-AMINONICOTINSÄUREAMID AUF DEN CATECHOLAMIN- UND ATP-GEHALT DER NEBENNIEREN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

R.UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

vorgelegt von
Ulf Schacht
aus Berlin

Dekan:	Professor Dr. med. Adalbert Loeschke
Referent:	Priv. Doz. Dr. med. Gerhard Senft
Korreferent:	Professor Dr. med. Herbert Herxheimer

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 8.4.1965

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Einleitung		5
Methodik		
I.	Tiermaterial und Aufarbeitung der Organe	6
II.	Extraktion von Catecholaminen aus dem Gewebe 1. Reagentien 2. Arbeitsgang	6
III.	Bestimmung der Catecholamine 1. Prinzip der Methode 2. Reagentien 3. Arbeitsgang 4. Berechnung des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes	7
IV.	Bestimmung von DOPA und Dopamin	11
V.	Bestimmung der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure im Rattenurin	12
VI.	Bestimmung von ATP 1. Reagentien 2. Extraktion von ATP aus dem Gewebe 3. Bestimmung des ATP A) Prinzip der Methode B) Ausführung der enzymatischen Reaktion C) Berechnung	13
VII.	Statistische Auswertung	16
Ergebnisse		
I.	Veränderungen im Adrenalingehalt der Nebennieren nach Gabe von 3-AP und 6-AN	17
II.	Veränderungen im Noradrenalingehalt der Nebennieren nach Gabe von 3-AP und 6-AN	17
III.	Der ATP-Gehalt d. Nebennieren nach Gabe von 6-AN	18
IV.	Der molare Quotient Catecholamin/ATP	18
V.	Der Quotient Cat./ATP nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit Nebennierenrindenhormon	19
VI.	Die Ausscheidung d. 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure im Harn nach Gabe von 6-AN	20

	Seite
Diskussion	21
Zusammenfassung	25
Abbildungen	26
Literaturverzeichnis	33

EINLEITUNG

6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) und 3-Acetylpyridin (3-AP) haben als Analoge des Nicotinsäureamids zunehmende Beachtung gefunden. Durch ihre Anwendung ist es möglich, definierte Störungen enzymatischer Reaktionen zu erzeugen. Die Bedeutung der betroffenen Umsetzung für bestimmte zelluläre Leistungen kann hierdurch geprüft und erkannt werden. Als Beispiel sei auf die Einschränkung des tubulären Natriumtransportes hingewiesen, die nach intrazellulärer Biosynthese von 6-Aminonicotinsäureamid-adenindinucleotid (6-ANAD) und 6-Aminonicotinsäureamid-adenindinucleotid-2-phosphat (6-ANADP) auftritt (HERKEN und NEUHOFF 1964, HERKEN, SENFT und ZEMISCH 1964).

Eine weitere Stoffwechselstörung zeigt sich in einer Hyperglykämie, die nach Gabe von 3-AP von SCHREIBER, FISCHER und KMENTORA (1962) und nach Injektion von 6-AN von V. BRUCHHAUSEN (1964) beschrieben wurde. Es ist nicht bekannt, auf welchem Wege der Glukoseanstieg zustande kommt.

Die Beobachtung, daß der Blutzucker bei adrenalektomierten Ratten unter dem Einfluß der 6-amino-substituierten Verbindung nicht erhöht wird (SCHACHT, SCHULTZ und SENFT 1965 b), ließ an eine Beteiligung der Nebennierenrindenhormone denken. Der Corticosterongehalt der Nebennierenrinde bleibt nach der Injektion von 6-AN unverändert (LOSERT 1965). Es ist somit unwahrscheinlich, daß eine vermehrte Glukoneogenese für die Erhöhung der extrazellulären Glukosekonzentration verantwortlich ist.

Wir haben daher untersucht, ob die Hyperglykämie mit einer Abnahme des Catecholamingehaltes der Nebennieren unter dem Einfluß von 6-AN und 3-AP einhergeht und durch eine vermehrte Adrenalininkretion ausgelöst wird.

METHODIK

I. Tiermaterial und Aufarbeitung der Organe

Für die Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten von einem Gewicht zwischen 150 - 200 g verwendet. Die Tiere erhielten das Trockenfutter Altromin R der Firma Altrogge und Leitungswasser ad libitum. Sie wurden bei 28° C Raumtemperatur gehalten.

Nach Dekapitation (ohne Narkose) präparierten wir die Nebennieren möglichst rasch und befreiten sie von dem sie umgebenden Fettgewebe. Die bindegewebige Kapsel wurde mit den anhängenden Teilen der zona glomerulosa entfernt.

II. Extraktion von Catecholaminen aus dem Gewebe

Die Catecholamine wurden nach dem von ANTON und SAYRE (1962) angegebenen Verfahren extrahiert.

1. Reagentien
(sie wurden sämtlich mit vierfach destilliertem Wasser angesetzt)

a) Aluminiumoxyd (Al_2O_3, neutral, Merck)
Aufarbeitung und Aktivierung: Auf 100 g Al_2O_3 werden 500 ml 2N HCl gegeben. Nach Abdecken des Gefäßes rühren wir das Gemisch mit einem Magnetrührer 45 Min. bei 90 - 100° C. Wir warten, bis sich das Aluminiumoxyd abgesetzt hat, dekantieren die Säure und rühren erneut zweimal mit je 250 ml 2N HCl bei 70° C 10 Min. Dieser Vorgang wird mit 500 ml 2N HCl bei einer Temperatur von 50° C wiederholt und die überstehende Salzsäure abgegossen. Das Al_2O_3 wird mit 200 ml aqua dest. so oft gewaschen, bis die Waschflüssigkeit einen pH von 3,4 hat. Anschließend erhitzen wir das Al_2O_3 eine Stunde bei 120° C und zwei Stunden bei 200° C und bewahren es nach Abkühlen im Exsiccator auf.

b) Perchlorsäure 0,4N ($HClO_4$)

c) Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA-Na_2 = Titriplex III)

d) Natrium-metabisulfit ($Na_2S_2O_5$)
Die 10%ige wäßrige Lösung wird täglich neu hergestellt.

e) Essigsäure 0,2N (CH_3COOH)

2. Arbeitsgang

Beide Nebennieren eines Tieres werden in 10 ml eisgekühlter Perchlorsäure mit einem vorgekühlten Ultraturrax Gerät homogenisiert, anhängende Gewebs- und Säurereste möglichst quantitativ mit destilliertem Wasser vom Homogenisator abgespült und mit dem Homogenat vereinigt. Anschließend wird bei 2°C und 30 000 g 30 Min. lang zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert, mit 0,4N Perchlorsäure auf 25 ml aufgefüllt und in ein 50 ml-Becherglas überführt, das 400 mg Al_2O_3 und 200 mg Titriplex III enthält. Dazu geben wir 1 ml $Na_2S_2O_5$ - Lösung.

Das pH wird durch Zugabe von NaOH auf einen Wert von 8,6 eingestellt und der Inhalt des Becherglases 5 Min. lang gerührt. Abweichungen vom eingestellten pH-Wert korrigieren wir durch weiteres Einleiten von NaOH. Nach Adsorption der Catecholamine an das Aluminiumoxyd wird dieses durch 2 Min. langes Schütteln mit ca. 10ml Aq-IV-dest. vier mal in Schliffzentrifugengläsern gewaschen, die Waschflüssigkeit durch kurzes Abzentrifugieren vom Aluminiumoxyd getrennt, vorsichtig abgesaugt und verworfen.

Anschließend werden die Catecholamine mit definierten Volumina 0,2N Essigsäure vom Al_2O_3 durch 30 Min. langes Schütteln eluiert und die abgegossene Elutionsflüssigkeit vom restlichen Al_2O_3 durch Zentrifugieren (15 Min. bei 30 000 g) befreit. Die in einem aliquoten Teil des Überstandes vorhandenen Catecholamine bestimmen wir nach Oxydation mit Jod spektrophotofluorometrisch.

III. Bestimmung der Catecholamine

Wir benutzten hierzu ein von SHORE und OLIN (1958) angegebenes Verfahren.

1. Prinzip der Methode

Zum qualitativen Nachweis der Hormone bedient man sich ihrer Eigen-

schaft, mit Oxydationsmitteln unter Bildung von Nor- bzw. Adrenochromen zu reagieren, die in alkalischem Milieu zu Adreno- bzw. Noradrenolutinen umgewandelt werden (Abb. 1). Die Endprodukte haben Anregungs- und Fluoreszenzmaxima, die sich durch ihre Wellenlänge von den anderen Catecholaminen sowie vom Tryptophan und seinen Derivaten unterscheiden. Adrenalin und Noradrenalin können auf diese Weise unabhängig von den genannten Verbindungen nachgewiesen werden.

Zur getrennten Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin wird die folgende Feststellung ausgenutzt:

Vom Noradrenalin wird im Vergleich zum Adrenalin weniger als 1% oxydiert, wenn die Umsätze im stärker sauren Milieu (pH 3) durchgeführt und die Reaktionszeit auf 6 Min. beschränkt wird (Abb. 2. Vergleiche A pH 3 mit NA pH 3). Unter diesen Bedingungen wird nach anschließender Alkalisierung fast ausschließlich Adrenolutin gebildet. Seine Fluoreszenz entspricht den eingesetzten Adrenalinkonzentrationen, so daß die methylierte Verbindung auf diese Weise quantitativ bestimmt werden kann.

Bei höherem pH-Wert (pH 5) werden dagegen beide Catecholamine oxydiert. Bei dieser Wasserstoffionenkonzentration entstehen sowohl Adreno- als auch Noradrenochrom, die nach ihrer Überführung in Adreno- bzw. Noradrenolutin gemeinsam gemessen werden. Die Noradrenalinkonzentration wird durch Subtraktion des Adrenalinanteiles von der Gesamtfluoreszenz ermittelt.

2. Reagentien
   a) Salzsäure, 0,01N (HCl)
   b) Natriumacetatpuffer, 2M. 1) pH 3 2) pH 5
   c) Standard-Catecholamin-Lösung
      Stammlösung: 1 mol 10^{-6}/ml 0,01N HCl. Die Lösung wird bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.
   d) Jod, 0,1N (J_2). Das elementare Jod wird in absolutem Alkohol gelöst und unter Lichtabschluß gut verschlossen aufbewahrt.

e) Natriumthiosulfat, 0,05N ($Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ in wäßriger Lösung)

f) Alkalische Ascorbinatlösung. 100 mg Ascorbinsäure werden ad 20 ml H_2O gelöst und 10 ml 10N NaOH unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

3. Arbeitsgang

Aliquote Teile eines jeden Eluates der Gewebeproben werden in vier Reagenzgläser pipettiert. Zwei von diesen enthalten je 1 ml Acetatpuffer pH 3, zwei andere je 1 ml Acetatpuffer pH 5. Der Inhalt wird mit 0,01N HCl ad 4 ml aufgefüllt. 0,1 ml der Jodlösung wird in je ein Reagenzglas der beiden verschiedenen pH-Ansätze pipettiert. Hierdurch werden die Catecholamine zu Adrenochromen oxydiert. Die nicht mit Jod versetzten Proben dienen zur Ermittlung derjenigen Fluoreszenz, die nicht auf die Catecholamine zurückzuführen ist. Sie werden im weiteren Arbeitsgang genauso wie die oxydierten Ansätze behandelt. Die Einwirkung des Oxydationsmittels wird auf 6 Min. begrenzt. Danach werden allen Ansätzen 0,2 ml einer wäßrigen Natriumthiosulfatlösung zugefügt. Überschüssiges Jod wird auf diese Weise reduziert und damit die Oxydation unterbrochen. Zugabe von 1 ml einer frisch bereiteten alkalischen Ascorbinatlösung bewirkt eine Isomerisation der Adrenochrome zu den entsprechenden Trihydroxyindolderivaten.

Die Bildung dieser Derivate ist lichtabhängig. Unzureichende Belichtung bewirkt eine unvollständige Umsetzung, so daß die Fluoreszenz unter dem Einfluß des bei der Aktivierung einfallenden Lichtes während der Messung noch weiter ansteigt. Eine exakte Bestimmung wird hierdurch erschwert oder sogar unmöglich gemacht. Wir haben deshalb die Proben der Einwirkung von diffusem Licht aus Leuchtstoffröhren eine Stunde lang ausgesetzt. Unmittelbar danach führten wir die Messung mit einem Aminco-Bowman-Spectral-Photofluorometer durch, das mit zwei Monochromatoren ausgestattet ist. Vor der Messung wurde das Maximum der Noradrenalinfluoreszenz ermittelt und eingestellt. Es hat eine Wellenlänge von 530 mμ, wenn die des aktivierenden Lichtes auf 400 mμ eingestellt wird (unkorrigierte Werte).

Zur Aufstellung der Eichkurven wurden anstelle des Eluates ansteigende Adrenalin- bzw. Noradrenalinkonzentrationen - in 3 ml HCl gelöst - in beide pH-Ansätze eingesetzt. Zur Ermittlung des Reagentienleerwertes wurden gleiche Volumina 0,01N HCl verwendet.

Um die während des Arbeitsganges auftretenden Catecholaminverluste zu bestimmen, wurden definierte Aminmengen an das Aluminiumoxyd adsorbiert (siehe Kap. II,2). 3 ml des Eluates wurden in den oben beschriebenen Oxydationsgang eingesetzt, für Adrenalin mit Acetatpuffer von pH 3, für Noradrenalin mit dem auf pH 5 eingestellten Puffer.

Die beschriebenen Ansätze und Arbeitsgänge sindin dem folgenden Schema zusammengefaßt (Abb. 3):

	Eich-kurve	Reagen-tien-leer-werte	Verlust durch d. Arbeits-gang	Catecholamingehalt des Gewebes	
				oxydiert	nicht oxydiert
Eluat (ml)	--	--	3	1	1
Eichlösung A. bzw. NA (ml)	3	--	--	--	--
HCl (ml)	--	3	--	2	2
pH 3 bzw. pH 5 Puffer (ml)	1	1	1	1	1
Jodlösung (0,1 ml)	+	+	+	+	--
$Na_2S_2O_3$ (0,2 ml)	+	+	+	+	+
Ascorbinat-lösung (1 ml)	+	+	+	+	+

4. Berechnung des Adrenalin- und Noradrenalingehaltes

Von der Fluoreszenz der Gewebeproben ziehen wir die Transmission ab, die bei der Messung des gleichen Ansatzes ohne vorangehende Oxydation

gewonnen wurde. Wir berücksichtigen damit Substanzen, die nicht als Trihydroxyindole vorliegen, deren Fluoreszenz aber in dem angegebenen Meßbereich liegt.

Der aus dem pH 3 - Ansatz gemessene Wert wird mit der bei gleichem pH erhaltenen Adrenalin-Eichkurve (von den Eichwerten wurden die Reagentienleerwerte abgezogen) verglichen und die im Eluat vorliegende Adrenalinkonzentration abgelesen.

Zur Bestimmung des Noradrenalin wird diese Adrenalinkonzentration in eine bei pH 5 aufgestellte Adrenalin-Eichreihe eingesetzt und die zugehörige Transmission ermittelt. Dieser Wert wird von der Fluoreszenz subtrahiert, die bei der Bestimmung des pH 5 - Ansatzes der Gewebeproben gemessen wurde und dem Adrenalin- sowie dem Noradrenalingehalt der Proben entspricht. Die Differenz wird mit der bei pH 5 aufgestellten Noradrenalin-Eichkurve verglichen und als im Eluat vorliegende Noradrenalinkonzentration abgelesen.

Aus den Catecholaminkonzentrationen werden die im Eluat vorliegenden Gesamtmengen berechnet. Wir berücksichtigen hierbei das Volumen der Elutionsflüssigkeit und den in den Oxydationsgang eingesetzten Anteil.

Ein Vergleich der eingesetzten mit den nach Durchlaufen des Arbeitsganges wiedergefundenen Aminmengen ergibt den Verlust, um den die Meßwerte korrigiert werden. Bei 11 Bestimmungen werden 60 % des eingesetzten Noradrenalin und 95 % des Adrenalin wiedergefunden.

Die gesamte Bestimmung wird ohne Unterbrechung durchgeführt.

IV. Bestimmung von DOPA und Dopamin

3,4-Dihydroxyphenylalanin und 3,4-Dihydroxyphenyl-äthylamin wurden nach der von CARLSON und WALDECK (1958) veröffentlichten Methode bestimmt.

Reagentien

a) Phosphatpuffer nach Sörensen (0,5M) pH 6,5

b) Jodlösung J_2 (0,02N) in 5%iger wäßriger KJ-Lösung

c) Natriumsulfit (0,04 g Na_2SO_3 7 H_2O werden in 10 ml H_2O gelöst und mit 5N NaOH ad 100 ml aufgefüllt)

d) Essigsäure (5N)

Für die Extraktion aus dem Gewebe wählten wir das gleiche Verfahren wie für die Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung. Der Oxydationsgang (Bildung von Dihydroxyindolen) ist dagegen verschieden.

In die mit aliquoten Volumina des Eluates und mit 1 ml 0,5M Phosphatpuffer (pH 6,5) angesetzten Reagenzgläser pipettieren wir 0,1 ml Jodlösung und reduzieren das überflüssige Jod nach 5 Min. mit 0,5 ml Na_2SO_3. Nach weiteren 5 Min. fügen wir 0,6 ml 5N Essigsäure hinzu.

Die Proben werden im Wasserbad von 45° C 30 Min. lang bei gleichzeitiger Belichtung erwärmt und anschließend auf ihren DOPA- und Dopamingehalt untersucht. Die fluorometrische Messung erfolgt bei einer Aktivierung von 315 mμ unter Benutzung des bei 408 mμ auftretenden Fluoreszenzmaximums (unkorrigierte Werte).

Die Berechnung des DOPA- und Dopamingehaltes der Gewebe wird unter Verwendung von Eichreihen durchgeführt.

V. Bestimmung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure-Ausscheidung im Rattenurin

Zu Beginn des Versuches erhielten die Ratten je 18 ml (10 und 8 ml im Abstand von 10 Min.) destilliertes Wasser durch eine im Magen liegende Schlundsonde. Danach wurden sie in Stoffwechselkäfige gesetzt, die eine getrennte Sammlung von Urin und Stuhl erlauben (HERKEN, SENFT und WILUTZKY 1956). Der Harn wurde über einen Zeitraum von 16 Stunden in Zylindergläsern aufgefangen, die 1 ml 2N Perchlorsäure und 2 ml $Na_2S_2O_5$ enthielten.

Der Sammelurin einer Tiergruppe (ca. 100 ml) wurde bei 2°C und 30 000 g 30 Min. zentrifugiert und der klare Überstand an 2 g Aluminiumoxyd unter Anwesenheit von 1 g Titriplex III adsorbiert (siehe Kap. II, 2). Von

dem Eluat setzten wir 3 ml in die mit 1 ml 0,5M Phosphatpuffer (pH 7,2) angesetzten Reagenzgläser ein.

Nach der Oxydation und Belichtung der Proben wurden sie bei einer Wellenlänge von 550 mμ dem Fluoreszenzmaximum der Mandelsäure gemessen. Die Aktivierung wurde bei 375 mμ vorgenommen (unkorrigierte Werte). Die durch den Vergleich mit Mandelsäure-Eichlösung errechneten Konzentrationen wurden mit dem Urinvolumen multipliziert.

VI. Bestimmung von Adenosin-5'-triphosphat

1. Reagentien (sie werden sämtlich mit vierfach destilliertem Wasser angesetzt)
   a) Magnesiumsulfat (0,015M) 37 mg ad 10 ml H_2O
   b) Cystein (0,2M) 31,5 mg cysteinum hydrochloricum + 0,5 ml dest. Wasser + 0,2 ml 1N NaOH. Mit dest. Wasser ad 1 ml auffüllen. Lösung täglich frisch ansetzen.
   c) Triäthanolaminpuffer. 3,32 ml des flüssigen Triäthanolamins mit wenig Wasser verdünnen. pH mit 1N HCl auf 7,6 einstellen. Mit dest. Wasser ad 200 ml auffüllen.
   d) EDTA-Na_2 = Titriplex III (Merck). 149 mg mit dest. Wasser ad 75 ml auffüllen. pH mit 0,1 N NaOH ad 7,6 einstellen. Mit dest. Wasser ad 100 ml ergänzen.
   e) 3-Phosphoglycerat ($1,6\ 10^{-4}$M). Stammlösung $8 \cdot 10^{-3}$M. 14,86 mg des Natriumsalzes in 10 ml H_2O lösen. Vor Gebrauch verdünnen.
   f) $NADH_2$ ($1,2\ 10^{-4}$) Stammlösung: 8,33 mg ad 5 ml 1%ige Natriumbicarbonatlösung. Lösung vor Gebrauch 1 : 25 verdünnen. (Stammlösung ist im Eisschrank eine Woche haltbar).
   g) Adenosin-5'-triphosphat (10^{-5}M)
   Stammlösung: 12,36 ATP-$Na_2H_2 \cdot 3\ H_2O$ mit dest. Wasser ad 2 ml auffüllen. (Bei der Einwaage ist der Reinheitsgrad des Präparates berücksichtigt worden) Vor Gebrauch zur Herstellung einer Eichreihe verdünnen. (Lösung im Eisschrank aufbewahren)

h) Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (10 mg Protein/ml, Boehringer, Mannheim) Ferment unverdünnt verwenden.

i) 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK) (10 mg Protein/ml, Boehringer, Mannheim) Ferment unverdünnt verwenden.

2. Extraktion von ATP aus dem Gewebe

Die Aufarbeitung des Gewebes und die Extraktion des ATP erfolgte in Anlehnung an eine von GREENGARD und STRAUB (1959) angegebene Methode, die für die Bestimmung des ATP in der peripheren Nervenfaser entwickelt wurde.

Nach Dekapitation der Tiere werden beide Nebennieren möglichst schnell entnommen, von ihrer bindegewebigen Kapsel mit dem anhängenden Teil der zona glomerulosa befreit, in Metallzentrifugenbecher geworfen, die ein definiertes Volumen des vorher zum Sieden erhitzten Triäthanolaminpuffer enthalten, mit Hilfe eines Spatels an der Becherwand zerkleinert und weitere 45 Sekunden im siedenden Puffer belassen. Danach wird die Probe durch Eintauchen des Bechers in flüssigen Stickstoff auf $0^{\circ}C$ abgekühlt.

Vom Töten der Tiere bis Einbringen der Nebennieren in die kochende Triäthanolaminlösung vergingen 30 Sekunden.

Unter Eiskühlung werden die Nebennieren anschließend mit einem Ultraturrax homogenisiert und das Volumen des Homogenates nach Aufsaugen mit einer fein kalibrierten Pipette bestimmt. Das Homogenat wird 4 Min. mit Chloroform geschüttelt, 10 Min. bei 3 000 g in der Kälte zentrifugiert und der klare Überstand in die Reaktion eingesetzt.

3. Bestimmung des ATP

A) Prinzip der Methode

Der Bestimmung von ATP liegen die beiden folgenden Reaktionen zugrunde:

a) ATP + 3-Phosphoglycerat $\xrightarrow{PGK}$ ADP + 1,3-Diphosphoglycerat

b) 1,3-Diphosphoglycerat + $NADH_2$ $\xrightarrow{GAPDH}$ Glycerin-aldehyd-3-phosphat + NAD + Phosphat

Glycerinaldehyd-3-phosphat wird mit Cystein abgefangen.

Wird die Umsetzung b von links nach rechts durchlaufen, so nimmt die $NADH_2$-Konzentration ab. $NADH_2$ kann durch Messung seiner Fluoreszenz (Maximum 475 mμ nach Aktivierung bei 345 mμ) quantitativ bestimmt werden. Das entstehende NAD stört die Messung nicht, weil es unter diesen Bedingungen nicht fluoresziert. Die $NADH_2$-Abnahme dient als Maß für die in der Reaktion a umgesetzte ATP-Menge (Abb. 4).

B) Ausführung der enzymatischen Reaktion

Folgendes Reaktionsgemisch wird vor der Messung hergestellt:

4 Vol	$MgSO_4$-	)
1 Vol	$NADH_2$ -	)
4 Vol	3-Phosphoglycerat -	) Lösung
1 Vol	Cystein -	)

Danach werden nacheinander in die Küvette pipettiert:

0,55 ml Reaktionsgemisch
0,20 ml des Überstandes (Gewebs-ATP) nach vorangehender Erwärmung auf 20°C
0,20 ml Wasser

Nach Ablesen der Transmission hinzufügen:

0,04 ml GAPDH
0,01 ml PGK

Ablesen der Transmission bis der Endwert erreicht ist (10 - 15 Min.).

Zur Aufstellung einer Eichreihe werden nacheinander in die Küvette pipettiert:

0,55 ml Reaktionsgemisch
0,10 ml ATP-Standardlösung
0,10 ml Triäthanolaminpuffer
0,20 ml Wasser

Nach Ablesen der Transmission hinzufügen:

0,04 ml GAPDH
0,01 ml PGK

Ablesen der Transmission bis der Endwert erreicht ist.

Die Reaktionen laufen bei einer Temperatur von 20°C ab.

C) Berechnung

Die aus den Gewebsextrakten ermittelten Werte werden in eine Eichkurve eingesetzt und der ATP-Gehalt des eingesetzten Überstandes abgelesen. Die in den Nebennieren vorhandenen ATP-Mengen werden unter Berücksichtigung des Puffervolumens berechnet, das nach Aufsaugen des Homogenates (siehe Kap. VI, 2) ermittelt wurde. Dieses Volumen wird als Lösungsraum des in der Gewebsprobe vorhandenen ATP angenommen. Das Bezugssystem hat gegenüber dem einpipettierten Puffervolumen den Vorteil, die Verdampfungsverluste und das Gewebswasser der Nebennieren zu erfassen und zu berücksichtigen.

Die errechneten Werte werden noch um den ATP-Verlust korrigiert, der während des Arbeitsganges aufgetreten ist und mit Hilfe eines internen Standards ermittelt wird.

Definierte Volumina eines Nebennierenhomogenates werden in zwei siedende Pufferlösung enthaltende Becher pipettiert. In einen der beiden Becher wird gleichzeitig eine bekannte ATP-Menge eingefüllt. Eine gleiche ATP-Probe wird in einen dritten Metallbecher pipettiert, der kein Homogenat enthält. Diese drei Ansätze werden gleichmäßig behandelt (siehe Kap. VI, 2) und ihr ATP-Gehalt bestimmt. Von dem unter Zusatz von ATP-Standardlösung gemessenen Wert wird das im Gewebshomogenat enthaltene ATP subtrahiert und die Differenz mit der direkt gemessenen ATP-Menge (ohne vorheriges Erhitzen im siedenden Puffer) verglichen. Der durch die Erhitzung des ATP bedingte Verlust wird durch einen Vergleich der direkt bestimmten mit den durch den Arbeitsgang gelaufenen ATP-Mengen berechnet.

VII. Statistische Auswertung

Die Streuung (Varianz) wurde aus der Formel

$$\sigma^2 = \frac{\Sigma (x^2) - m \cdot \Sigma x}{n - 1}$$

der mittlere Fehler der Mittelwerte (Absolutfehler) "ε" aus der Gleichung

$$\varepsilon^2 = \frac{\sigma^2}{n}$$

berechnet, die Wahrscheinlichkeit der Abweichungen "p" nach dem von PÄTAU (1943) angegebenen Verfahren bestimmt.

Auf den Abbildungen haben wir die Mittelwerte "m", sowie den mittleren Fehler der Mittelwerte "ε" eingetragen.

ERGEBNISSE

I. Veränderungen im Adrenalingehalt der Nebennieren nach Gabe von 3-AP und 6-AN

Männliche Ratten erhielten 50 mg/kg 6-AN und 80 mg/kg 3-AP. Die Verbindungen wurden in physiologischer Kochsalzlösung (in einem Volumen von 10 ml/kg Tier) intraperitoneal injiziert. Den Kontrolltieren verabfolgten wir gleiche Volumina der NaCl-Lösung.

Beide Substanzen, sowohl 3-AP als auch 6-AN, haben die Eigenschaft, den Adrenalingehalt der Nebennieren zu senken. Die unter dem Einfluß der Pyridinderivate auftretenden Veränderungen unterscheiden sich jedoch in ihrer Intensität und Dauer:

6-AN erniedrigt den Adrenalingehalt in der sechsten Stunde des Versuches stärker als 3-AP. Sechzehn Stunden nach Injektion ist ein Einfluß des 3-AP nicht mehr zu erkennen. Nach Gabe von 6-AN fällt der Adrenalingehalt dagegen auch nach der sechsten Stunde noch weiter ab. In der sechzehnten Stunde werden nur noch 7% des Ausgangswertes gemessen (Abb. 5, 6, 7).

II. Veränderungen im Noradrenalingehalt der Nebennieren nach Gabe von 3-AP und 6-AN

Auch der Noradrenalingehalt der Nebennieren wird unter dem Einfluß der Nicotinsäureanaloge gesenkt.

Die nach Gabe von 3-AP auftretenden Veränderungen des Noradrenalingehaltes gleichen denjenigen, die wir bei der Messung des Adrenalin festgestellt haben: nach einem initialen Abfall ist nach der sechsten Stunde keine Störung mehr nachweisbar.

Nach 6-AN hatten wir einen kontinuierlichen Abfall des Nebennierenadrenalin gemessen. Der Noradrenalingehalt sinkt zunächst ebenfalls ab, steigt aber nach der sechsten Stunde wieder an und erreicht nach sechzehn Stunden die bei den Kontrollen gemessenen Werte.

Die folgende Betrachtung macht den überwiegenden Einfluß des 6-AN auf das Adrenalin noch deutlicher: die Nebennieren der Kontrolltiere enthalten fast fünfmal mehr Adrenalin als Noradrenalin. Sechzehn Stunden nach Injektion des Analogen hat sich das Verhältnis umgekehrt. Der Noradrenalingehalt ist jetzt zweieinhalbmal größer als der des Adrenalin (Abb. 5, 6, 7).

Die weiteren Untersuchungen wurden wegen der nachhaltigeren Wirkung der 6-amino-substituierten Verbindung mit dieser Substanz durchgeführt.

III. Der Adenosin-5'-triphosphatgehalt der Nebennieren nach Gabe von 6-AN

Der Adenosin-5'-triphosphatgehalt der Nebennieren nimmt unter der Einwirkung von 6-AN zunächst um nahezu den gleichen Prozentsatz wie der des Adrenalin ab. Von der dritten bis zur sechzehnten Stunde wird das Nebennieren-ATP aber nur noch relativ geringfügig, auf jeden Fall viel weniger als das Adrenalin, erniedrigt (Abb. 6).

IV. Der molare Quotient Catecholamin/ATP

Der überwiegende Anteil des Noradrenalin und Adrenalin ist in den Nebennieren an ATP gebunden (SHORE 1962). Eine Erniedrigung des ATP-Gehaltes könnte daher zu einer Abnahme der Bindungsfähigkeit des Gewebes für Catecholamine und einer Reduktion der Hormone führen. Durch die Aufstellung der molaren Catecholamin/ATP Quotienten hat man versucht, zwischen Veränderungen zu unterscheiden, die mit einer äquivalenten oder verschieden großen Ab- bzw. Zunahme von Catecholaminen und ATP einhergehen.

Der Adrenalin/ATP Quotient bleibt bis zur dritten Stunde nach der Injektion von 6-AN unverändert. In der sechsten Stunde fällt er geringfügig ab. Sechzehn Stunden nach Versuchsbeginn ist er mit 0,31 auf 11 %

des Ausgangswertes abgesunken. Diese starke Reduktion wird durch den die ATP-Abnahme weit übersteigenden Adrenalinverlust erklärt.

Die Adrenalin + Noradrenalin/ATP Quotienten sind wegen des höheren Gesamtcatecholamingehaltes verständlicherweise größer als die Adrenalin/ATP Quotienten. Bis zur sechsten Stunde erniedrigen sich beide Quotienten nahezu um den gleichen Prozentsatz. Nach der sechsten Stunde ist der mit beiden Hormonen gebildete Quotient zwar ebenfalls weiter abgefallen, liegt aber mit 31,5% des Ausgangswertes dreimal so hoch wie der zum gleichen Zeitpunkt bestimmte Adrenalin/ATP Quotient (Abb. 8) . Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, daß sich der Noradrenalingehalt bereits wieder weitgehend normalisiert hat (siehe Kap. II).

V. Der Quotient Catecholamin/ATP nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem Glucocorticoid

Die Werte der stationären ATP-Konzentration, die zur Aufstellung der molaren Catecholamin/ATP Quotienten verwendet wurden, haben wir bei der Analyse der Nebenniere erhalten. Dabei wurde das ATP der Nebennierenrinde miterfaßt. Um diesen Anteil des Nebennieren-ATP soweit wie möglich für die Messung auszuschließen, haben wir versucht, das Rindengewebe zu einer Atrophie zu bringen. Zu diesem Zweck verabfolgten wir Ratten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 10 mg Dexamethason/kg und Tag durch intraperitoneale Injektion. Eine histologische Kontrolle ließ nach dieser Behandlung eine deutliche Atrophie der Nebennierenrinde erkennen.

Der Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Nebennieren werden durch die Zufuhr von Dexamethason nicht verändert. Der ATP-Gehalt fällt dagegen ab. Diese Erniedrigung kann auf den Schwund des Nebennierenrindengewebes und des in ihm vorhandenen ATP zurückgeführt werden. Die Adrenalin/ATP- sowie die Adrenalin + Noradrenalin/ATP Quotienten steigen infolgedessen an (Abb. 9).

6-AN bewirkt auch unter diesen Bedingungen eine Abnahme des Catecholamin- und ATP-Gehaltes der Nebennieren.

VI. Die Ausscheidung der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Harn nach der Gabe von 6-AN

Die Abnahme des Catecholamingehaltes der Nebennieren, die wir nach Gabe von 6-AN feststellten, könnte auf einer Synthesestörung des Noradrenalin bzw. Adrenalin beruhen. Andererseits ist es möglich, daß die Aufnahme der Hormone in die Granula herabgesetzt ist, oder die bereits gespeicherten Catecholamine in vermehrtem Maße freigesetzt werden.

Die intragranuläre Bindung schützt die Amine vor ihrem Abbau. Eine Beeinträchtigung ihrer Speicherung würde mit einer erhöhten renalen Ausscheidung ihrer Abbauprodukte einhergehen, da die im Zytoplasma vorhandenen Catecholamine unter Mitwirkung der Monaminooxydase, besonders aber der O-Methyltransferase rasch in ausscheidungsfähige Metabolite umgewandelt werden. Wir haben daher untersucht, ob die Abnahme des Catecholamingehaltes der Nebenniere mit der vermehrten Ausscheidung eines Metaboliten im Harn einhergeht, dessen Fluoreszenzspektrum mit dem der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure identisch ist.

Die Elimination des Metaboliten steigt nach Gabe von 6-AN auf ungefähr das Doppelte der Kontrollwerte an (Abb. 10).

DISKUSSION

Die Applikation von 6-AN bewirkt eine Anzahl von Stoffwechselstörungen, die sich unter anderem in einer schlaffen Lähmung der Extremitäten, einer Einschränkung des tubulären Kalium- und Natriumtransportes der Nieren und einer Hyperglykämie bemerkbar machen. Hinzu kommt die bisher nicht bekannte Abnahme des Catecholamingehaltes der Nebennieren, die durch eine überwiegende Reduktion des Adrenalin gekennzeichnet ist.

Die Frage, auf welchem Wege eine Adrenalinverarmung der Nebennieren unter dem Einfluß des 6-AN zustandekommt, ist bei dem augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse nicht eindeutig zu beantworten.

Eine Verminderung des Catecholamingehaltes der Nebennieren kann durch verschiedene Pharmaka erzielt werden. Das bekannte Beispiel ist die nach Reserpin. Der Effekt dieser Verbindung wird durch eine Verminderung der Catecholaminaufnahme in die chromaffinen Granula des Nebennierenmarks erklärt (BERTLER, HILLARP und ROSENGREN 1961, KIRSHNER 1962, CARLSSON, HILLARP und WALDECK 1962). Die im Zytoplasma verbleibenden Amine unterliegen der Einwirkung der Aminooxydase und in weitaus größerem Ausmaß der O-Methyltransferase (VANE 1962, siehe dort weitere Literatur) und werden in stoffwechsel-inaktive Produkte umgewandelt. Eine Abnahme der intragranulären Speicherung wird in der Nebenniere zu einer besonders starken Erniedrigung des Catecholamingehaltes führen, da der überwiegende Anteil der Amine in den Granula gefunden wird (BLASCHKO und WELCH 1953, HILLARP, LAGERSTEDT und NILSON 1953). Sechzehn Stunden nach Gabe von 6-AN war der Adrenalingehalt der Nebennieren auf 7% des Kontrollwertes erniedrigt. Diese extreme Verarmung muß mit einer Reduktion der in den Granula gebundenen Catecholamine einhergehen.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß der Einwärtstransport in die Granula auch unter dem Einfluß des 6-AN gestört ist. Der Angriff des 6-AN ist aber offenbar nicht der gleiche wie beim Reserpin: 6-AN erniedrigt den Adrenalingehalt der Nebennieren auch dann, wenn dieser bereits durch eine vorherige Injektion von Reserpin auf einen Wert gesenkt worden war, der einem an-

nähernd maximalen Effekt (sechszehn Stunden nach Gabe von Reserpin) der verwendeten Reserpindosis entsprach. Reserpin kann eine durch 6-AN bedingte Adrenalinverarmung noch weiter verstärken (SCHACHT, SCHULTZ und SENFT 1965 a).

Eine weitere Differenzierung zeigt sich bei dem Vergleich der Catecholamin/ATP Quotienten. Reserpin bewirkt eine annähernd prozentual gleiche Abnahme des Catecholamin- und ATP-Gehaltes der Nebennieren (KIRPEKAR, CERVONI und COURI 1963) und der Nebennieren-Gesamtgranula (SCHÜMANN 1958). Unter dem Einfluß des 6-AN ist der Quotient nur bis zur dritten Stunde post injektionem konstant. Von diesem Zeitpunkt an wird der ATP-Gehalt nicht mehr weiter gesenkt, so daß bei der starken Adrenalinverarmung eine extreme Abnahme des Quotienten resultiert. Es ist daher auch nicht anzunehmen, daß die 6-AN-bedingte Abnahme des Adrenalingehaltes auf einer verminderten Bereitstellung von ATP beruht, welches zur Bindung der Amine in den Granula der Nebenniere erforderlich ist (FALCK, HILLARP und HÖGBERG 1956, HILLARP 1958, HILLARP, HÖGBERG und NILSON 1955, BLASCHKO, BORN, D'IORIO und EADE 1956).

Die durch Gabe von 6-AN erzielten Veränderungen sind durch eine Adrenalinverarmung gekennzeichnet, welche die Noradrenalinabnahme weit übersteigt. Nach Injektion von Reserpin wird der Adrenalin- und Noradrenalingehalt dagegen um einen nahezu gleichen Prozentsatz erniedrigt, so daß der Anteil des Noradrenalin am Gesamtcatecholamingehalt konstant bleibt. Dieser Befund läßt sich anhand eigener Untersuchungen (Abb. 11) darstellen und stimmt mit den von KIRPEKAR, CERVONI und COURI (1963) mitgeteilten Resultaten überein.

Das Noradrenalin der Nebennieren wird allerdings in der nach Überschreiten des Wirkungsmaximums des Reserpins auftretenden Erholungsphase schneller normalisiert als das Adrenalin (COUPLAND 1958). CALLINGHAM und MANN (1962) vertreten die Ansicht, daß die Methylierung des Noradrenalin eine Reaktion darstellt, deren Geschwindigkeit die Bildung des Adrenalins limitiert.

Eine Verlangsamung dieser Umsetzung könnte erklären, warum der Adrenalingehalt unter dem Einfluß des 6-AN erheblich stärker reduziert wird als der des Noradrenalin.

Bei einer verminderten Adrenalinbildung, die auf einer Beeinträchtigung der Methylierung des Noradrenalins beruht, wäre zu erwarten, daß der Noradrenalingehalt nicht nur relativ sondern auch absolut ansteigt, es sei denn, daß auch dieses Amin in geringerem Ausmaß synthetisiert wird. Untersuchungen von NAGATSU, LEVITT und UDENFRIEND (1964) haben gezeigt, daß die Überführung des Tyrosins zum Dioxyphenylalanin unter Mitwirkung einer Tyrosinhydroxylase erfolgt, deren Aktivität von der Tetrahydrofolsäure abhängig ist. HERKEN und TIMMLER (1964) (1964 a) haben gefunden, daß die Aktivität der Dihydrodolsäureduktase auch von der Konzentration des bereitgestellten NADPH beeinflußt wird. Die Geschwindigkeit der Dihydrofolsäure-Reduktion zur Tetrahydrofolsäure war bei Anwesenheit von 3-APADPH [1] deutlich verlangsamt. 6-AN wird ebenfalls nach vorangehender Injektion in das NAD und NADP eingebaut, wie JOHNSON und McCOLL (1956), DIETRICH, FRIEDLAND und KAPLAN (1958), sowie HERKEN und NEUHOFF (1964) bei der Untersuchung der Pyridinnucleotide aus Rattennieren gefunden haben. BRUNNEMANN, COPER und NEUBERT (1964) berichteten über eine Biosynthese von 6-ANADP in der Leber. Es ist nicht ausgeschlossen, daß 6-ANADP auch in den Nebennieren auftritt und die Bildung der als Cofaktor der Tyrosinhydroxylase fungierenden Tetrahydrofolsäure hierdurch verlangsamt wird.

Eine definitive Abgrenzung der Wirkung des Reserpins von der des 6-AN gelingt unter Berücksichtigung der mit der Adrenalinverarmung einhergehenden Störung des Kohlehydratstoffwechsels, einer nach 6-AN auftretenden Hyperglykämie. Reserpin 4 mg/kg bewirkt sechs Stunden nach der intravenösen Injektion keine Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut, obwohl der Adrenalingehalt der Nebennieren zu diesem Zeitpunkt ungefähr genauso stark erniedrigt ist wie durch 6-AN (SCHACHT, SCHULTZ und SENFT 1965 b).

Die 6-AN-bedingte Hyperglykämie wird dagegen offenbar durch eine vermehrte Abgabe von Adrenalin ausgelöst. Die Störung im Kohlehydratstoffwechsel bleibt bei adrenalektomierten Tieren aus (v. BRUCHHAUSEN 1964, SCHACHT,

[1] reduziertes 3-Acetylpyridinadenindinucleotid-2-phosphat

SCHULTZ und SENFT 1965 b). Dihydroergotamin, das den durch Injektion von Adrenalin (NORTHROP und PARKS 1964, SCHACHT, SCHULTZ und SENFT 1965 b) oder zyklischem Adenosinmonophosphat (NORTHROP und PARKS 1964) bedingten Blutzuckeranstieg verhindert, hebt auch die nach Gabe von 6-AN auftretende Hyperglykämie nahezu vollständig auf (SCHACHT, SCHULTZ und SENFT 1965 b).

Die glykogenolytische Wirkung von endogenem oder appliziertem Adrenalin wird auf eine Aktivierung der ATP-Cyclase mit nachfolgender vermehrter Bildung von zyklischem AMP in der Muskulatur und Leber zurückgeführt (SUTHERLAND und RALL 1960). Zyklisches AMP aktiviert seinerseits die Glykogen-Phosphorylase-b-Kinase, so daß vermehrt Phosphorylase a entsteht. Die aktive Phosphorylase steigert die Geschwindigkeit der Phosphorylase unter Bildung von Glukose-1-phosphat. Die Leistungsfähigkeit dieses Systems im tierischen Organismus ist nach der Injektion von 6-AN offenbar nicht eingeschränkt. Die Glykogenphosphorylase-b-Kinase wird zwar in vitro durch 6-ANADP gehemmt (v. BRUCHHAUSEN 1964), in vivo scheinen jedoch die zur Beeinträchtigung der enzymatischen Reaktion erforderlichen Hemmstoffkonzentrationen sechs Stunden nach der Applikation von 6-AN nicht aufzutreten.

ZUSAMMENFASSUNG

An Ratten wurde untersucht, ob der Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Nebennieren nach intraperitonealer Applikation von 3-AP (80 mg/kg) und 6-AN (50 mg/kg) verändert wird.

Beide Pyridinnucleotide senken den Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Nebennieren. Die Wirkung des 3-AP ist geringer als die des 6-AN und nach sechzehn Stunden bereits wieder abgeklungen.

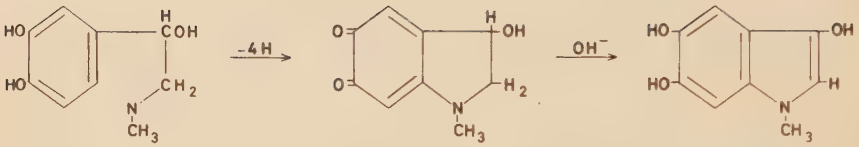
Applikation von 6-AN bewirkt einen kontinuierlichen Abfall des Nebennieren-Adrenalin. Sechzehn Stunden nach der Injektion des Nicotinsäure-Analogen ist der Adrenalingehalt auf 7% des Ausgangswertes erniedrigt.

Das Noradrenalin der Nebennieren wird im Beginn der 6-AN-Vergiftung ebenfalls gesenkt. In der siebzehnten Stunde hat sich der Noradrenalingehalt aber fast normalisiert. Der Anteil des Hormons an den Gesamtcatecholaminen ist von 20% auf 75% angestiegen.

Der ATP-Gehalt des endocrinen Organs fällt zunächst um den gleichen Prozentsatz ab wie das Adrenalin, so daß der A/ATP Quotient konstant bleibt. Sechzehn Stunden nach der Gabe des 6-AN sind die Nebennieren viel stärker an Catecholaminen als an ATP verarmt. Der Catecholamin/ATP Quotient ist jetzt erheblich kleiner geworden.

Die Abnahme des Catecholamingehaltes der Nebennieren ist von einem Anstieg der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Harn begleitet.

Es wird diskutiert, ob die Störung im Catecholaminstoffwechsel der Nebennieren zur Entstehung der Hyperglykämie beiträgt, die nach Injektion von 6-AN regelmäßig zu beobachten ist: die Reduktion des 6-AN-bedingten Blutzuckeranstieges durch das Adrenolytikum Dihydroergotamin und das Ausbleiben des 6-AN-Effektes bei adrenalektomierten Tieren sprechen dafür, daß die festgestellte Adrenalinverarmung mit einer vermehrten Inkretion des Hormons einhergeht und die Störung im Kohlehydratstoffwechsel auslöst.



ADRENALIN ADRENOCHROM ADRENOLUTIN

Abb. 1: Oxydation von Adrenalin zu Adrenochrom und Umwandlung in Adrenolutin.
(entsprechende Reaktionen beim Noradrenalin)

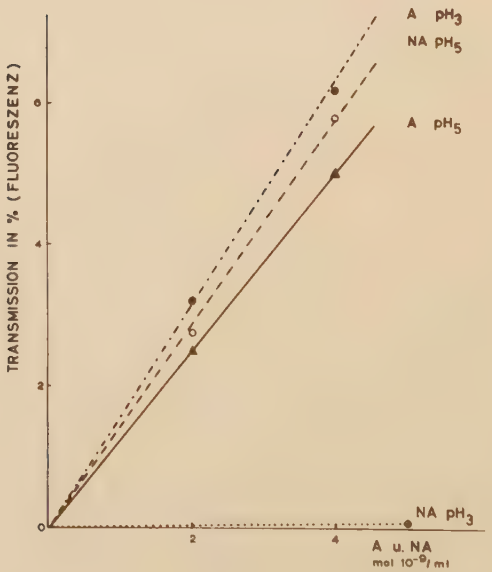


Abb. 2: Eichkurven Adrenalin (A) und Noradrenalin (NA)

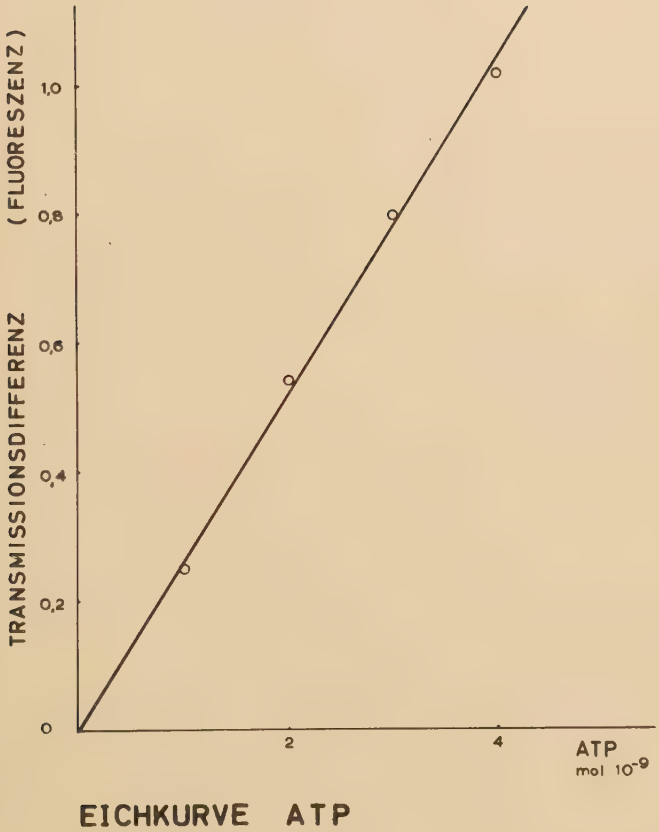

TRANSMISSIONSDIFFERENZ (FLUORESZENZ)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
2
4
ATP
mol 10⁻⁹
EICHKURVE ATP

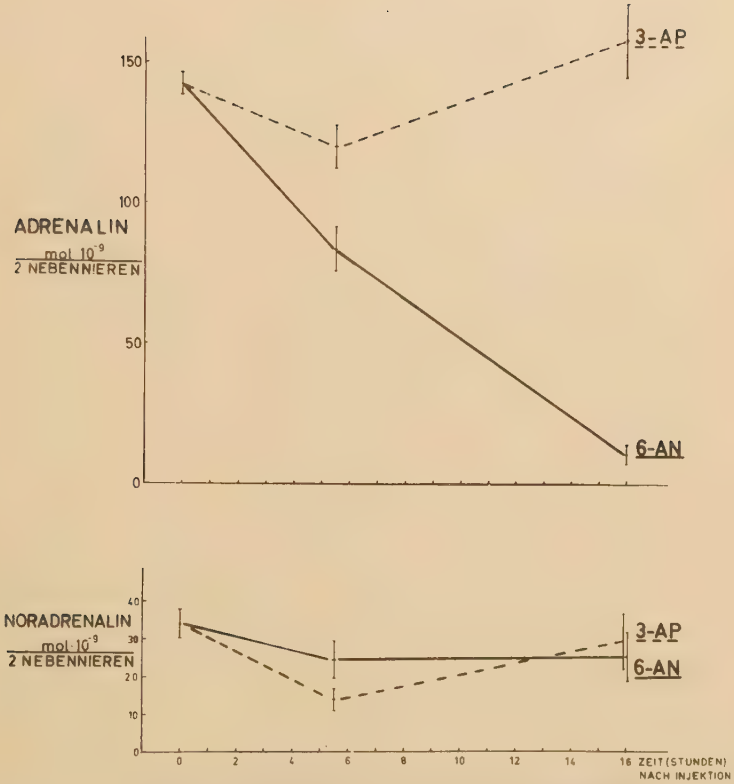
Abb. 4:

		ADRENALIN $\frac{mol \cdot 10^{-9}}{2\ NN}$	NORADRENALIN $\frac{mol \cdot 10^{-9}}{2\ NN}$
KONTROLLEN		142,2 ± 4,1 n = 44	34,1 ± 3,8 n = 37
		p > 0,2 — p < 0,02	p > 0,5 — p < 0,0002
3-AP	6.	119,9 ± 7,7 n = 12	13,7 ± 3,0 n = 12
		p = 0,02	p > 0,05
	17. STD. nach INJEKTION	158,2 ± 13,1 n = 7	29,0 ± 7,6 n = 7

Abb. 5: Veränderungen im Adrenalin- und Noradrenalingehalt der Nebennieren nach Gabe von 80 mg/kg 3-Acetylpyridin i.p.

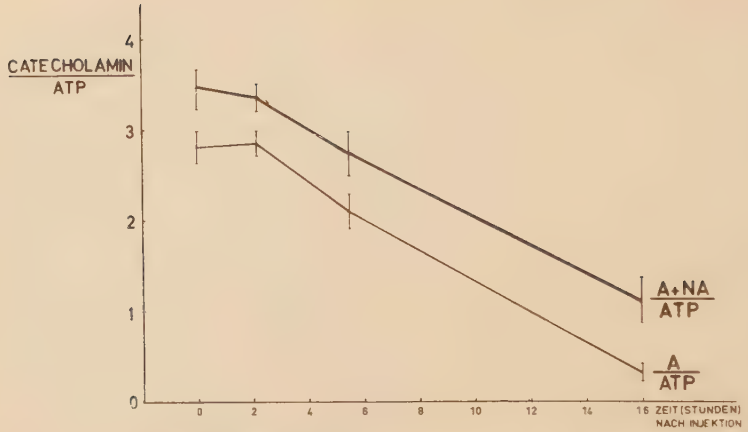
		ADRENALIN $\frac{mol \cdot 10^{-9}}{2\ NN}$	NORADRENALIN $\frac{mol \cdot 10^{-9}}{2\ NN}$	ATP $\frac{mol \cdot 10^{-9}}{2\ NN}$
KONTROLLEN		142,2 ±4,1 n=44	34,1 ±3,8 n=37	50,8 ±3,2 n=30
		p<0,0002	p<0,005	p<0,005
6-AN	3.	113,9 ±3,5 n=6	19,9 ±2,7 n=6	40,1 ±1,5 n=8
		p<0,002		
	6.	83,8 ±7,8 n=22	24,4 ±4,8 n=15	40,3 ±1,7 n=12
		p<0,0002		p<0,02
	17. STD. nach INJEKT.	10,0 ±3,3 n=10	24,9 ±6,6 n=10	32,3 ±2,4 n=8

Abb. 6: Veränderungen im Adrenalin-, Noradrenalin- und ATP-Gehalt der Nebennieren nach Gabe von 50 mg/kg 6-Aminonicotinsäureamid i.p.



ADRENALIN- UND NORADRENALINGEHALT DER NEBENNIEREN NACH i.p. INJEKTION VON 6-AN (50 mg/kg) bzw. 3-AP (100 mg/ kg)

Abb. 7:



CATECHOLAMIN / ATP - QUOTIENTEN NACH GABE VON 50mg/kg 6-AN

$\frac{A+NA}{ATP} = \frac{\text{ADRENALIN + NORADRENALIN (mol } 10^{-9})}{\text{ADENOSIN-5'-TRIPHOSPHAT (mol } 10^{-9})}$

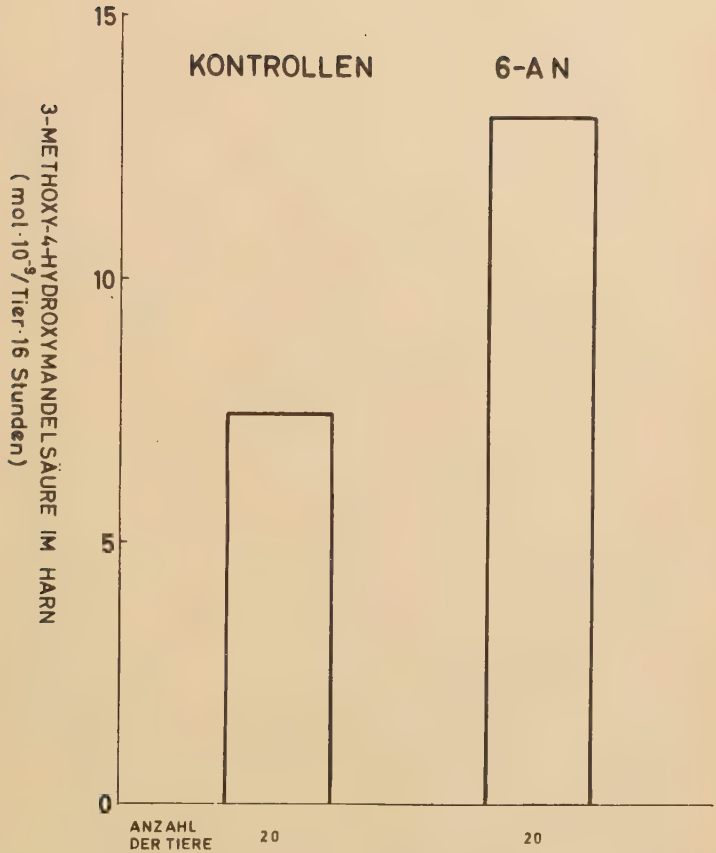
$\frac{A}{ATP} = \frac{\text{ADRENALIN (mol } 10^{-9})}{\text{ADENOSIN-5'-TRIPHOSPHAT (mol } 10^{-9})}$

Abb. 8:

	A (ADRENALIN) mol 10^{-9}	NA (NORADREN.) mol 10^{-9}	A+NA mol 10^{-9}	ATP mol 10^{-9}	A+NA / ATP
KONTROLLEN	142,2 +4,1 n=44	34,1 +3,8 n=37	176,3 +5,6	50,8 +3,2 n=30	3,46 +0,24
DEXAMETHASON n=6	138,7 +3,6	34,4 +2,1	173,1 +4,1	44,4 +2,1	3,90 +0,21
DEXAMETHASON +6-AN n=6	112,3 +3,2	34,9 +4,5	147,1 +5,5	36,7 +2,6	4,01 +0,32

ANSTIEG DES CATECHOLAMIN / ATP -QUOTIENTEN BEI NNR-ATROPHIE DURCH 5-TÄGIGE VORBEHANDLUNG MIT DEXAMETHASON (10mg/kg u. Tag i.p.)

Abb. 9:



STEIGERUNG DER 3-METHOXY-4-HYDROXYMANDEL-SÄURE-AUSSCHEIDUNG IM HARN NACH GABE VON 50 mg/kg 6-AMINONICOTINSÄUREAMID

Abb. 10:

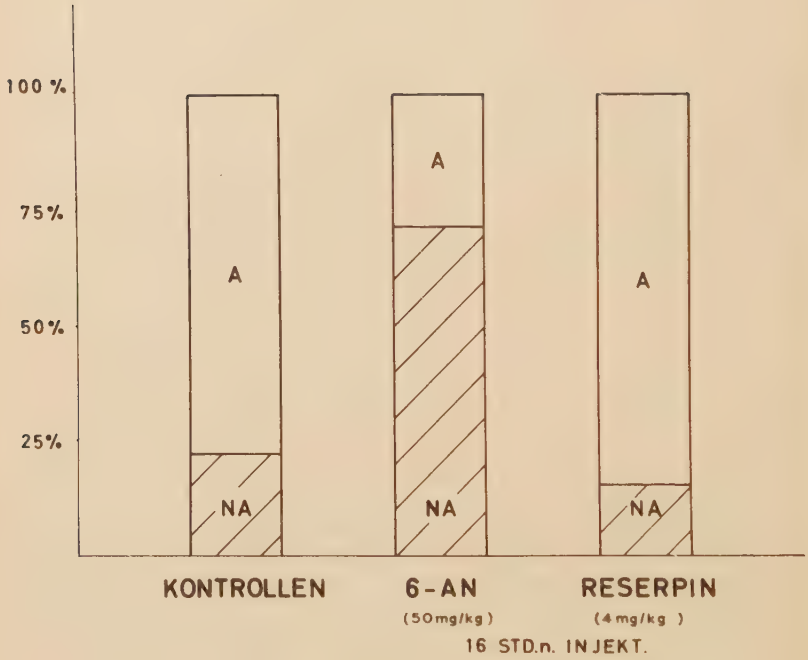


Abb. 11: Anteil des Noradrenalin am Gesamtcatecholamingehalt der Nebennieren nach Injektion von 6-AN bzw. Reserpin

LITERATURVERZEICHNIS

ANTON, A.H. and D.F. SAYRE: A study of the factors affecting the aluminium oxide trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. J. Pharm. exp. Ther. 138, 360 (1962).

BERTLER, A., N.-A. HILLARP and E. ROSENGREN: Effect of reserpine on the storage of new-formed catecholamines in the adrenal medulla. Acta physiol. scand. 52, 44 (1961).

BLASCHKO, H., G.V.R. BORN, A. D'IORIO and N.R. EADE: Sedimentation of adrenal medullary granules in hypertonic sucrose. J. of Physiol. 132, 544 (1956).

BLASCHKO, H. and A.D. WELCH: Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 219, 17 (1953).

BOWMAN, R.L., P.A. CAULFIELD and U.S. UDENFRIEND: Spectrophotofluorometric assay in the visible and ultraviolet. Science 122, 32 (1955).

v. BRUCHHAUSEN, F.: Über die in vitro-Hemmung der Phosphorylase-Aktivierungsreaktion (Phosphorylase-Kinasereaktion) durch 6-Aminonicotinamid-Adenin-Dinucleotid (6-ANAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 247, 376 (1964).

BRUNNEMANN, A., H. COPER und D. NEUBERT: Biosynthese und Wirkung des 6-Amino-nicotinamid-adenindinucleotids (6-ANAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 246, 437 (1964).

CALLINGHAM, B.A. and M. MANN: Depletion and replacement of the adrenaline and noradrenaline contents of the rat adrenal gland, following treatment with reserpine. Brit. J. Pharmakol. 18, 138 (1962).

CARLSSON, A., N.-A. HILLARP and B. WALDECK: A Mg -ATP dependent storage mechanism in the amine granules of the adrenal medulla. Med. exp. 6, 47 (1962).

CARLSSON, A. and B. WALDECK: A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). Acta physiol. scand. 44, 293 (1958).

COUPLAND, R.E.: Synthesis and storage of pressor amines in adrenal medullary grafts. J. Endocrin. 18, 162 (1959).

DIETRICH, L.S., J.M. FRIEDLAND and L.L. KAPLAN: Pyridin nucleotide metabolism: mechanism of action of the niacin antagonist 6-AN. J. Biol. Chem. 233, 964 (1958).

FALCK, B., N.-A. HILLARP and B. HÖGBERG: Content and intracellular distribution of adenosine triphosphat in cow adrenal medulla. Acta physiol. scand. 36, 360 (1956).

GREENGARD, P. and1 R.W. STRAUB: Effect of frequency of electrical stimulation on the concentration of intermediary metabolites in mammalian non-myelinated fibris. J. Physiol. 148, 353 (1959).

HERKEN, H. und V. NEUHOFF: Spektrofluorometrische Bestimmung des Einbaues von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 247, 187 (1964).

HERKEN, H., G. SENFT und H. WILUTZKY: Die Erzeugung von Natrium- und Wasserrerentionen zur Prüfung der Diuretica. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 299, 123 (1956).

HERKEN, H., G. SENFT und B. ZEMISCH: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthaltender Nucleotide. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 249, 54 (1964).

HERKEN, H. und R. TIMMLER: Kinetik der Dihydrofolsäurereduktase aus Rattenleber und -gehirn mit 3-APADPH + H^+ als Wasserstoffdonator. - Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 250, 293 (1965).

HILLARP, N.-A.: Enzymic systems involving adenosine phosphates in the adrenaline and noradrenaline containing granules of the adrenal medulla. Acta physiol. scand. 42, 144 (1958).

HILLARP, N.-A., B. HÖGBERG and B. NILSON: Adenosine triphosphat in the adrenal medulla of the cow. Nature (Lond.) 176, 1032 (1953).

HILLARP, N.-A., S. LAGERSTEDT and B. NILSON: The isolation of the granular fraction from the suprarenal medulla, containing the sympathomimatic catecholamines. Acta physiol. scand. 29, 251 (1953).

JOHNSON, W.J. and J.D. McCOLL: Antimetabolic activity of the 6-aminonicotinamid. Fed. Proc. 15, 284 (1956).

KIRPEKAR, S.M., P. CERVONI and D. COURI: Depletion and recovery of catecholamines and adenosinetriphosphat of rat adrenal medulla after reserpine treatment. J. of Pharm. exp. therap. 142, 71 (1963).

KIRSHNER, N.: Uptake of catecholamines by a particulate fraction of the adrenal medulla. Science 135, 107 (1962).

LOSERT, W.: Unveröffentlichte Untersuchungen aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin (1964).

NAGATSU, T., M. LEVITT and S. UDENFRIEND: Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. J. Biol. Chem. 239, 2910 (1964).

NORTHROP, G. and R. E. PARKS, Jr.: The effects of adrenergic blocking agents and theophylline on 3', 5'-AMP-induced hyperglycemia. J. Pharm. exp. Ther. 145, 87 (1964).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (Eine t-Tafel). Biol. Zbl. 63, 154 (1943).

SCHACHT, U., G. SCHULTZ und G. SENFT: Störungen im Katecholaminstoffwechsel der Nebennieren nach Applikation von 6-Aminonicotinsäureamid. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 250, 281 (1965 a).

SCHACHT, U., G. SCHULTZ und G. SENFT: Unveröffentlichte Untersuchungen aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin, (1965 b).

SCHREIBER, V., J. FISCHER and V. KMENTORA: Some metabolic and endocrine changes in acute 3-acetylpyridine poisening in rats. Physiol. Bohemoslov. 11, 212 (1962).

SCHÜMANN, H.J.: Die Wirkung von Insulin und Reserpin auf den Adrenalin- und ATP-Gehalt der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 233, 119 (1958).

SHORE, P.A.: Release of serotonine and catecholamines by drugs. Pharmacological Reviews 14, 531 (1962).

SHORE, P.A. and J.S. OLIN: Identification and chemical assay of norepinephrine in brain and other tissues. J. Pharm. 122, 295 (1958).

SUTHERLAND, E.W. and T.W. RALL: The relation of adenosine-3', 5'-phosphat and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacological Reviews 12, 265 (1962).

VANE, J.R.: Catecholamines. Recent advance in pharmacology, 3rd edition. J. & A. Churchill, Ltd., London 1962.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. med. H. HERKEN. Ihm und dem Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. SENFT möchte ich zum Abschluß für ihre freundliche Hilfe und ihre Ratschläge danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. G. SCHULTZ für die Anleitung bei der Ausführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 7. März 1938 wurde ich in Berlin geboren als Sohn des Facharztes für Chirurgie Dr. med. Karl-Theodor Schacht und seiner Ehefrau Waltraut, geb. Neuendorff.

Nach unserer Übersiedlung nach Bramsche im Jahre 1945 besuchte ich dort die Volksschule und bestand am humanistischen Gymnasium in Osnabrück im Februar 1958 die Reifeprüfung.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1958 an der Universität in Tübingen und setzte es in München und Würzburg fort, wo ich im September 1960 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Nach Studien in Düsseldorf und Graz bestand ich im November 1963 in Freiburg das medizinische Staatsexamen.

Seit dem 2. Januar 1964 bin ich am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin als Medizinalassistent tätig. In dieser Zeit fertigte ich meine Dissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an.

Photodruck der Photo Copie GmbH.